

На правах рукописи



Кобахидзе Тамара Ильинична

**Высокоэффективная тонкослойная хроматография в анализе растительных
источников и лекарственных средств, содержащих рутин**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Раменская Галина Владиславовна

Официальные оппоненты:

Сливкин Алексей Иванович – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической технологии, заведующий кафедрой

Джавахань Марина Аркадьевна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научно-образовательный институт фармации им. К. М. Лакина, заместитель директора

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «17» июня 2026 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.002.02
доктор фармацевтических наук, профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день в практике фармакопейного анализа лекарственных средств (ЛС) применяют хроматографические (высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ), газовая хроматография), химические (титриметрическое определения вещества, качественные реакции), оптические (спектрофотометрия, рефрактометрия, поляриметрия) методы.

Среди хроматографических методов наиболее широко распространенным является метод ВЭЖХ. При этом ТСХ также находит применение в аналитических исследованиях, что связано с доступностью и легкостью воспроизведения метода.

Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) – это хроматографический метод анализа и разделения сложных смесей веществ, который является более усовершенствованным видом ТСХ. Этот метод основан на разделении компонентов смеси за счёт их различной способности адсорбироваться неподвижной твердой фазой. В ВЭТСХ этот процесс ускоряется и становится более эффективным благодаря использованию специальных условий (увеличения площади раздела подвижной и неподвижной фазы за счёт уменьшения диаметра частиц сорбента и большей однородности размеров этих частиц), а также применение оборудования, которое обеспечивает быстрое и точное разделение сложных смесей веществ. Использование ВЭТСХ позволяет одновременно проводить идентификацию и количественное определение биологически активных веществ (БАВ), что отвечает современным тенденциям гармонизации отечественных требований с международными фармакопеями (Европейская, Американская), где ВЭТСХ широко используется для анализа растительных препаратов.

Следует отметить, что в зарубежных фармакопейных статьях уже в названии отражена рекомендация применения метода ВЭТСХ в анализе лекарственных средств растительного происхождения: фармакопея США 47 – национальный формуляр 42 – <203> High-performance thin-layer chromatography procedure for identification of articles of botanical origin («метод ВЭТСХ для идентификации сырья растительного происхождения»); европейская фармакопея 11.0 – 2.8.25. High-performance thin-layer chromatography of herbal drugs and herbal drug preparations («ВЭТСХ лекарственного растительного сырья и препаратов растительного происхождения»).

В действующей фармакопее Евразийского экономического союза (ЕАЭС) представлена фармакопейная статья 2.1.2.26 «Тонкослойная хроматография», в которой описан раздел количественного измерения с применением ВЭТСХ-пластин.

В государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) XV издания в ОФС.1.2.1.2.0003 «Тонкослойная хроматография» описаны преимущества метода ВЭТСХ,

однако практическое применение данного метода в анализе веществ не находит отражения в частных фармакопейных статьях.

Флавоноиды, как класс растительных полифенолов, широко используются в фармацевтической промышленности в качестве БАВ. Рутин, в частности, является одним из наиболее распространенных и изученных флавоноидов, присутствующих во многих фитопрепаратах и многокомпонентных лекарственных средствах. Несмотря на глубокое изучение его структурно-функциональных характеристик и фармакологического профиля, актуальность контроля качества рутин-содержащих препаратов остается высокой. Это обусловлено необходимостью обеспечения точности дозирования, стабильности и чистоты активного вещества в готовых лекарственных формах.

В связи с этим, разработка и валидация эффективных и надежных аналитических методик для качественного обнаружения и количественного определения рутина является критически важной задачей.

Настоящее исследование направлено на создание таких методик с применением метода ВЭТСХ.

Степень разработанности темы исследования

В зарубежной научной литературе метод ВЭТСХ широко использован. В Фармакопее США (USP 47 NF 42) помимо общей статьи, посвященной ВЭТСХ, представлены частные статьи с его применением в более чем в 100 объектах растительного происхождения для определения состава и количественного содержания БАВ. В Европейской фармакопее 11-го издания также представлено более 60 видов лекарственного растительного сырья (ЛРС), для анализа БАВ которых используют ВЭТСХ.

В ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России разработана методика количественного определения суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого методом ВЭТСХ (Моргунов И.М. и др., 2023 г.). Авторами из Воронежского Государственного Университета предложен способ количественного определения рутина методом ТСХ (Тринеева О.В. и др., 2014 г.). Профессор Университета Ла Троба и кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Сеченовского Университета Агатонович-Куштрин Снежана показывает широкое практическое применение ВЭТСХ в научных исследованиях в различных областях: в фармации, в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве и др.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – разработка и валидация методик определения биологически активных веществ методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии для контроля качества лекарственных средств, содержащих рутин.

Задачи исследования:

1. Провести информационно-аналитическое исследование научной литературы, отражающей текущее состояние и перспективы применения метода ВЭТСХ в анализе природных соединений.
2. Разработать методики и подобрать условия для хроматографического определения рутина методом ВЭТСХ в объектах растительного происхождения на примере фармакопейного ЛРС (фиалки трава, *Violae herba*).
3. Валидировать разработанную методику в соответствии с требованиями нормативной документации.
4. Апробировать разработанную методику и провести анализ рутина в растительных источниках его получения (гречихи посевной трава, *Fagopyri esculenti herba* и софоры японской бутоны, *Sophorae japonicae alabastra*).
5. Оценить возможность применения разработанной методики ВЭТСХ для анализа рутина в лекарственных средствах (субстанция, таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид»).

Научная новизна

В результате проведенного исследования автором впервые разработана методика качественного и количественного определения рутина в лекарственном растительном сырье (фиалки трава, *Violae herba*) методом ВЭТСХ, позволяющая повысить точность и воспроизводимость оценки содержания маркерного соединения по сравнению с традиционными спектрофотометрическими методами. Разработанная методика была оптимизирована и применима к растительным источникам получения рутина (трава гречихи, бутоны софоры). Также на основании представленной методики был проведен анализ рутина в лекарственных средствах (субстанции, таблетках).

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования включает в себя обзор имеющихся научных данных о преимуществах метода ВЭТСХ и его широком применении в различных отраслях экономики.

Практическая значимость результатов исследования состоит в том, что, используя один из перспективных физико-химических методов анализа, разработаны методики идентификации и количественного определения рутина методом ВЭТСХ в лекарственных средствах, обеспечивающие повышение точности, воспроизводимости и экологичности анализа за счёт минимального расхода растворителей и отказа от токсичных проявляющих реагентов, что способствует оптимизации процесса стандартизации и соответствует современным

фармакопейным требованиям. Полученные результаты могут быть использованы для контроля качества лекарственных средств и лекарственного растительного сырья, содержащих рутин, а также рекомендованы для включения в нормативную документацию. Разработанные методики дают возможность эффективно определить рутин как в растительных объектах, так и в лекарственных средствах.

Методология и методы исследования

Методология исследования была построена на систематизации литературных данных и общих принципах фармакопейного анализа по установлению критериев, обеспечивающих достижение требуемого уровня стандартизации лекарственных средств, а также критической оценке существующих методик определения биологических активных веществ методом ВЭТСХ.

В рамках проводимого исследования были применены химические, физико-химические и инструментальные методы, такие как титриметрия, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия (СФМ), и высокоэффективная тонкослойная хроматография. Идентификация и количественное определение рутозида проводились с помощью набора оборудования для ВЭТСХ. Результаты были получены на денситометре Vilver Quantum E5 при ультрафиолетовом свете (254 нм и 365 нм) и белом свете. Обработку результатов, полученных в ходе исследования, осуществляли при помощи программного обеспечения (ПО) BioVision, а также с помощью Origin: Data Analysis and Graphing Software и Microsoft Office Excel.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная методика одновременного проведения качественного и количественного анализа рутина методом ВЭТСХ на примере фармакопейного ЛРС (фиалки трава, *Violae herba*).
2. Результаты валидации разработанной методики определения рутина методом ВЭТСХ по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность.
3. По результатам исследования оптимизированные и валидированные методики определения рутина методом ВЭТСХ в фитообъектах, являющихся источником рутина (гречихи посевной трава, *Fagopyri esculenti herba* и софоры японской бутоны, *Sophorae japonicae alabastra*).
4. Разработанная и апробированная методика количественного определения рутина в многокомпонентном препарате и активной фармацевтической субстанции (АФС).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует пунктам 2, 3 и 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия: п. 2. «Формулирование и развитие принципов

стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; п. 3. «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; п. 6. «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность основывается на проведении валидации разработанных методик качественного и количественного определения рутина в растительных источниках его получения, и лекарственных средств на его основе, по требованиям ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Методики валидированы по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность. Разработанные методики характеризуются селективностью и воспроизводимостью, сочетают относительную простоту исследования с точностью. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием поверенного и аттестованного оборудования. Выводы и рекомендации базируются на достаточном объеме экспериментальных данных, подвергнутых статистической обработке.

Основные положения диссертационной работы и результаты исследования были представлены на: Международной научно-практической конференции «Интеграция фармакопейных требований в международных исследованиях лекарственных растительных препаратов (Россия, г. Москва, 2023); I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения профессора К. А. Кузьминой (Россия, г. Саратов, 2023 г.); Semmelweis International Students Conference 2023 of Semmelweis University Budapest (Венгрия, г. Будапешт, 2023 г.); The 5th International Congress on Pharmacy Updates/4th IPharms Annual Conference (Иран, г. Тегеран, 2022); VII Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» организованной Фондом Нурсултана Назарбаева и Южно-Казахстанской медицинской академией (Республика Казахстан, г. Шымкент, 2020 г.); The 2nd China-Russia Young Scholars International Symposium (Китай, г. Гуанчжоу, 2021 г.); The 4th International Congress on Pharmacy Updates/3rd IPharms Annual Conference (Иран, г. Тегеран, 2021), конференции «Современное состояние проблем фармации и фармакологии ДВ России и стран АТР» I Дальневосточного международного медицинского конгресса (ФГБОУ ВО «Дальневосточный Государственный медицинский университет» МЗ РФ) (Россия, г. Хабаровск,

2020); The 3th International Congress on Pharmacy Updates/2rd IPharms Annual Conference (Иран, г. Тегеран, 2020).

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 3 от «15» октября 2025 г.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе темы и методов исследования. Автором лично проведен выбор объектов исследования: фармакопейное ЛРС (фиалки трава), растительные источники получения рутина (гречихи трава, софоры бутоны), лекарственные средства на основе рутина (субстанция, таблетки). Диссертантом лично проведена серия экспериментов анализа рутина методом ВЭТСХ в перечисленных объектах исследования, результатом которой является разработанная методика качественного и количественного определения рутина в многокомпонентных объектах исследования. Вклад автора является важнейшим на всех этапах исследования: от постановки цели и задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях. Результаты исследования были доложены автором лично на международных и всероссийских научных и научно-практических конференциях и внедрены в практику научно-практических и образовательных организаций. Результаты работа были статистически обработаны и систематизированы в научных статьях и докладах. Текст диссертации и автореферата написан автором самостоятельно.

Внедрение результатов диссертационного исследования в практику

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации Кобахидзе Тамары Ильиничны внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Общая фармацевтическая химия» по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (акт № 657 от 05.05.2025); в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «Фармакогнозия» по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (акт № 657 от 05.05.2025), в учебный процесс фармацевтического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

«Воронежский государственный университет» при изучении дисциплин «Общая фармацевтическая химия», «Фармакогнозия», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (акт № 1500-200 от 18.09.2025.).

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена согласно тематике и плану научно-исследовательских работ кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, из них 3 статьи в изданиях, включенных в международные индексируемые базы данных Web of Science, Scopus, Chemical Abstracts; 1 иная публикация по результатам исследования, 4 публикации в сборниках материалов и международных и всероссийских научных конференций (из них 3 зарубежных конференции).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 страницах, состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), экспериментальной части (Главы 2-5), общих выводов, списка сокращений (списка сокращений и условных обозначений), списка литературы и трех приложений. Список литературы включает 139 источников (46 из которых зарубежные). Работа содержит 12 рисунков и 31 таблицу, а также 1 таблицу в приложении.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами исследования в данной работе являлись рутозид (производитель: Сычуань Гуансун Фармасьютикал Ко.Лтд, Китай, Номер реестровой записи ФС-000569 от 06.05.2013, содержание вещества 95 %); лекарственное растительное сырье: фиалки трава (производитель: ОАО "Красногорсклексредства", ЛСР-001062/08); гречихи посевной трава (производитель: «Компания ХОРСТ», Алтайский край, ТУ 9185-300-14721358-13); софоры японской бутоны (производитель: «Компания ХОРСТ», Алтайский край, ТУ 10.89.19-124-14721358-2017); таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид» (производитель: Открытое акционерное общество

"Фармстандарт-Уфимский витаминный завод" (ОАО "Фармстандарт-УфаВИТА", ЛП-№(005097)-(ПГ-RU)). В качестве стандартных образцов (СО) использовали растворы рутина ($\geq 94,0$ %, MERCK, Sigmaaldrich, MFCD00149490, CAS Number 250249-75-3), кверцетина (≥ 95 %, MERCK, Sigmaaldrich, MFCD03847906, CAS Number: 849061-97-8), аскорбиновой кислоты ($\geq 99,0$ %, MERCK, Sigmaaldrich, MFCD00064328, CAS Number: 50-81-7) с концентрацией 0,05 %.

Исследование проводили с применением соответствующего оборудования методом ВЭТСХ: для нанесения образцов использовали ручной аппликатор Nanomat 4, диспенсер и универсальный держатель (Camag®, Muttentz, Швейцария); элюирование осуществляли в автоматизированной хроматографической камере (Camag®, Muttentz, Швейцария); регистрацию хроматографических зон проводили в денситометре Vilver Quantum E5 при ультрафиолетовом свете (254 нм и 365 нм); обработку полученных данных проводили с ПО BioVision, входящим в комплект денситометра Vilver Quantum E5. В работе использовали ВЭТСХ пластины Silica gel 60 F254 разных размеров (5×10 см, 10×10 см, 10×20 см).

Извлечения из ЛРС получали с применением обратного холодильника на водяной бане лабораторной (Stegler WB-6, Китай).

Спектрофотометрическое исследование проводили на спектрофотометре Varian CARY 4000 UV-Vis (США), кювета с толщиной слоя 10 мм, оснащенной ПО для обработки данных – CaryWin UV Scan.

Для количественного определения рутозида методом кислотно-основного титрования в неводной среде использовали стандартное оборудование для титриметрического метода анализа (бюретка).

Реактивы имели градацию ХЧ («химически чистый») и ЧДА («чистый для анализа») и соответствовали требованиям, предъявляемым к реагентам для ВЭЖХ-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ лекарственного растительного сырья фиалки трава

Для идентификации БАВ в растительных препаратах в соответствии с ГФ РФ XV издания применяют метод ТСХ, для количественного определения суммы флавоноидов представлены физико-химические методы (как правило, спектрофотометрия). Одной из задач исследования была разработка методики обнаружения рутина методом ВЭТСХ (Рисунок 1).

В ходе анализа были изучены условия, влияющие на проведение исследования: получение извлечений, подбор подвижной фазы (ПФ), оптимальный объем пробы, способы детектирования.



Рисунок 1 – Этапы хроматографирования методом ВЭТСХ

Количественное определение проводили с применением расчетных формул 1 и 2:

$$X\% = \frac{Intx * m_{co} * P * 100 * 100 \%}{Intco * m_{лрс} * (100 - W)} \quad (1)$$

$$X\% = \frac{Intx * C_{co} * P}{Intco} \quad (2)$$

где Int_x – интенсивность анализируемого объекта, %; Int_{co} – интенсивность СО, %; m_{co} – навеска СО, г; $m_{лрс}$ – навеска сырья, г; C_{co} – концентрация СО, %; P – содержание основного вещества в СО, доли; 100 – коэффициент учета влажности; W – влажность сырья, %.

В ходе исследования были экспериментально подобраны и обоснованы теоретически оптимальные условия хроматографирования рутина. В настоящей работе были проанализированы апробированные ПФ с различными органическими растворителями. В ходе исследования была выбрана смесь с оптимальным составом: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода, в результате чего формируются компактные симметричные пятна. Следующим этапом был анализ соотношения компонентов смеси.

Известно, что pH среды влияет на результаты разделения веществ в тонкослойной хроматографии. Для веществ, проявляющих свойства кислот, кислотность среды влияет больше, чем температура. Уксусная кислота является более слабым кислотным модификатором, нежели муравьиная кислота.

В Таблице 1 представлены результаты элюирования рутина в различных кислотных ПФ с различным соотношением растворителей, подобранных экспериментальным путем. Следует отметить, что разделение при использовании муравьиной кислоты безводной было более четко выраженным.

Таблица 1 – Показатели R_f рутина как оценка пригодности хроматографической системы

№ ПФ	Смесь растворителей, мл	R_f	Результат
ПФ 1	Этилацетат: уксусная кислота ледяная: вода (10:10:40)	0,910±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 2	Этилацетат: уксусная кислота ледяная: вода (7,5:1,5:1,5)	0,455±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 3	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (32,5:7,5:10)	0,364±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 4	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4:6)	0,364±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 5	Этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40:4,7:5,3)	0,364±0,01	формируются компактные симметричные пятна
ПФ 6	Уксусная кислота ледяная: вода (60:40)	0,900±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 7	Муравьиная кислота безводная: вода (60:40)	0,363±0,01	пятна относительно выраженные
ПФ 8	Этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода (31:6,5:7)	0,400±0,01	формируются компактные симметричные пятна

Коэффициент подвижности определяется в пределах $R_f = 0-1$, а оптимальным значением является 0,3–0,5. В связи с высоким значением величины R_f ПФ №1 и №6 были исключены для дальнейшего анализа (Таблица 1). В ПФ №2, №3, №4 и №7 пятна были относительно выраженные, размытые. В ПФ №5 и №8 были сформированы компактные симметричные пятна. Таким образом, ПФ №5 и №8 были применены для обнаружения рутина в ЛРС фиалки трава. В результате ПФ №8 дала ярко-выраженные компактные симметричные пятна (Рисунок 2).

Для установления оптимальных условий хроматографирования в качестве экстрагента был использован этанол различной концентрации для определения разницы концентрации активных соединений, присутствующих в исследуемых образцах, в зависимости от типа растворителя.

Результаты ВЭТСХ-анализа показывают, что спирт 96 % растворяет большее количество активных компонентов (извлечение №1) из исследуемых образцов, чем спирт 70 % (извлечение №2), что проявляется в большей интенсивности полосы рутина и соответственно концентрации (Таблица 2).

Таблица 2 – Содержание рутина методом ВЭТСХ в траве фиалки, %

	СО рутина	Извлечение №1		Извлечение №2	
Объем пробы	3 или 5 мкл	3 мкл	5 мкл	3 мкл	5 мкл
Интенсивность, %	100	64,897	65,039	33,496	33,819
Содержание рутина, %		3,08	3,09	1,59	1,61

Также в ходе исследования был выявлен оптимальный объем пробы для анализа – 3 мкл (Рисунок 2). При исследовании 1 и 2 мкл, пятна были слабо выражены, при более высоком объеме – пятна были более насыщенные, что является хорошей оценкой подлинности вещества, но при этом размытые из-за перегрузки, что мешает анализу количественного определения.

Согласно исследованиям для визуального определения качества разделения хроматографическую пластину после элюирования обрабатывают детектирующим реагентом (например, дифенилборная кислота аминоэтилового эфира раствор 1 % в спирте 96 % и макрогол 400 раствор спиртовой 5 %). В настоящей работе было выявлено, что при детектировании хроматографических зон с помощью сканирования лучшие результаты достигаются без обработки детектирующим реактивом.

Экспериментальная цель данной работы состояла в разработке и валидации простой и надежной процедуры ВЭТСХ для обнаружения рутина в ЛРС, основанной на четком разделении сложной многокомпонентной системы и определении индивидуально идентифицированных веществ.

При подборе условий хроматографирования для идентификации и количественного определения отталкивались от физико-химических свойств рутина. После серии экспериментов оптимальными были признаны условия, описанные ниже.

Нанесение образцов на ВЭТСХ-пластинки Silica gel 60 F254 (5×10 см) осуществляли с помощью специального аппликатора Nanomat 4, диспенсера и универсального держателя. В ходе исследования подобран оптимальный объем пробы для анализа – 3 мкл. Расстояние между образцами было установлено 10 мм, расстояние от края пластины 15 мм; расстояние от нижнего края пластины составляло 25 мм. Перед началом элюирования пластинки обязательно просушивали потоком горячего воздуха в течение 30 сек. Насыщение камеры парами элюента составляло 20 мин. Время элюирования могло варьировать от 18 до 20 мин., за это время фронт растворителя проходит 70 мм от начала пластины. После хроматографирования пластины просушивали для удаления ПФ в течение 5 минут.

Цифровизацию пластин и получение хроматограмм осуществляли на денситометре Vilver Quantum E5. Обнаружение рутина проводили при длине волны 365 нм (Рисунок 2). Следует учесть, что возможность параллельного просмотра пластин (254 нм, 365 нм, дневной свет) на приборе при разных длинах волн способствует получению более комплексной оценки хроматограммы, что связано с проявлением определенных классов веществ при соответствующей им длине волны.

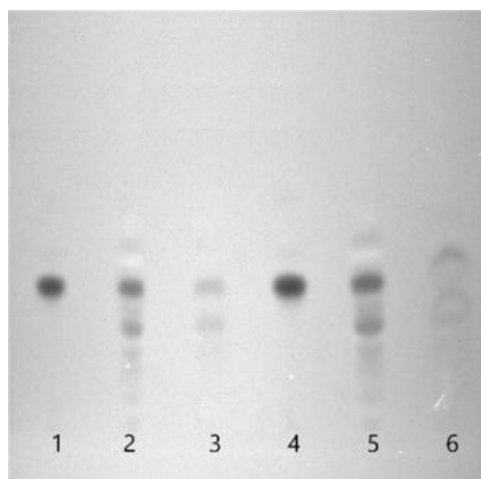


Рисунок 2 – Хроматограмма извлечений фиалки травы: 1 – СО рутина (3 мкл), 2 – извлечение №1 (3 мкл), 3 – извлечение №2 (3 мкл), 4 – СО рутина (5 мкл), 5 – извлечение №1 (5 мкл), 6 – извлечение №2 (5 мкл)

Программное обеспечение BioVision было использовано для измерения интенсивности светопоглощения пятнами. Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 1.

Процентное содержание рутина составило $3,08 \pm 0,01$ %. Результаты соответствуют требованиям ГФ РФ XIV издания, ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава».

Результаты количественного определения рутина методом спектрофотометрии в исследуемых образцах травы фиалки представлены в Таблице 3. Результаты соответствуют нормам ФС.2.5.0044.15 «Фиалки трава».

Таблица 3 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом в траве фиалки, %

	Оптическая плотность рутина при длине волны 410 нм	Процентное содержание рутина
СО рутина	1,01902	
СО рутина, раствор сравнения	0,10641	

Продолжение Таблицы 3

Извлечение №1	1,13656	3,43± 0,01
Извлечение №1, раствор сравнения	0,47784	
Извлечение №2	0,52493	2,42± 0,01
Извлечение №2, раствор сравнения	0,06082	

Согласно результатам количественного определения методом спектрофотометрии содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в извлечении №1 составило 3,43 %, в извлечении №2 – 2,42 %. Исходя из полученных результатов, представленных в Таблицах 2 и 3, допустимо предположение, что одним из основных и преобладающих количественно флавоноидом в траве фиалки является рутин.

Анализ лекарственного растительного сырья гречихи трава и софоры бутоны

На основании разработанной и валидированной методики, полученных при анализе извлечений из фиалки травы, провели анализ еще двух видов растительного сырья, которые, согласно литературным данным, являются основными источниками промышленного получения рутина в России и за рубежом, – софоры японской бутоны (*Sophorae japonicae alabastra*) и гречихи посевной трава (*Fagopyri esculenti herba*).

Для анализа гречихи травы и софоры бутонов были апробированы ПФ, представленные в Таблице 1. В качестве ПФ была выбрана смесь тех же растворителей, но с другим соотношением: этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (35:5:4), в результате чего наблюдались равные, обособленные пятна рутина ($R_f = 0,34$). Модификация ПФ необходима для более четкого разделения соединений в многокомпонентных объектах (Рисунок 3).

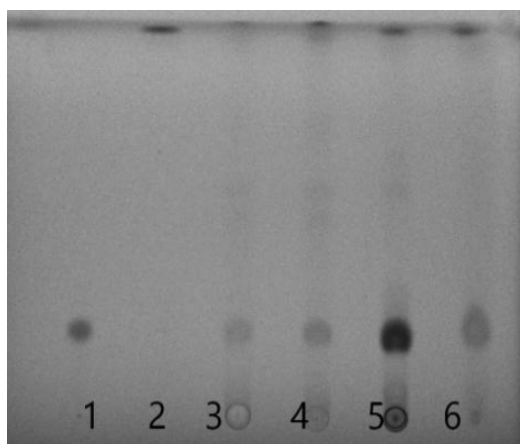


Рисунок 3 – Хроматограмма извлечений из гречихи травы и софоры бутонов:

- 1 – СО рутина, 2 – СО кверцетина; 3 – извлечение №2 травы гречихи;
4 – извлечение №1 травы гречихи; 5 – извлечение №1 бутонов софоры;
6 – извлечение №2 бутонов софоры

На основании серии проведенных испытаний была разработана методика обнаружения и количественного определения индивидуально идентифицированного соединения (рутина) в растительных объектах гречихи травы и софоры бутонов методом ВЭТСХ.

Процентное содержание рутина в извлечении №1 гречихи травы составило $4,82 \pm 0,03$ %, в извлечении №1 софоры бутонов – $6,16 \pm 0,01$ %. Кроме рутина в извлечении №1 софоры бутонов обнаружен агликон рутина – кверцетин, процентное содержание которого составило $4,87 \pm 0,02$ % (Таблица 4).

Таблица 4 – Содержание рутина и кверцетина в ЛРС гречихи травы и софоры бутоны, %

Образец	Интенс. рутина, %	Конц. рутина, %	Интенс. кверцетина, %	Конц. кверцетина %
Извлечение №1 травы гречихи	96,415	$4,82 \pm 0,03$		
Извлечение №1 бутонов софоры	123,238	$6,16 \pm 0,01$	97,389	$4,87 \pm 0,02$

В результате разработана методика количественного определения рутина методом ВЭТСХ с учетом основных физико-химических свойств соединения, позволяющая проводить скрининговую оценку процентного содержания рутина, а не суммы флавоноидов в пересчете на рутин, в исследуемых объектах. Полученные данные могут быть использованы при стандартизации софоры японской бутонов (*Sophorae japonicae alabastra*) и гречихи посевной травы (*Fagopyri esculenti herba*).

Разработанные методики определения рутина в ЛРС были валидированы по требованиям ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» и фармакопеи ЕАЭС 2.3.14.0. «Валидация аналитических методик» по показателям: специфичность, аналитическая область и линейность. Результаты валидации соответствуют требованиям нормативной документации.

Анализ субстанции рутозида

Рутозид (рутин) является гликозидом кверцетина, относящегося к группе флавонолов (Рисунок 4).

По совокупности экспериментальных данных, описанных в диссертационной работе, были предложены и теоретически обоснованы оптимальные условия определения рутина методом ВЭТСХ: неподвижная фаза – стеклянные пластинки, покрытые силикагелем, HPTLC plates (reversed phase) RP-18 F 254 (MERCK, Германия) 5x10; оптимальный объем пробы – 3 мкл

спиртового раствора рутозида; ПФ – этилацетат-муравьиная кислота безводная-вода (40:4,7:5,3); насыщение камеры парами элюента – 20 мин.

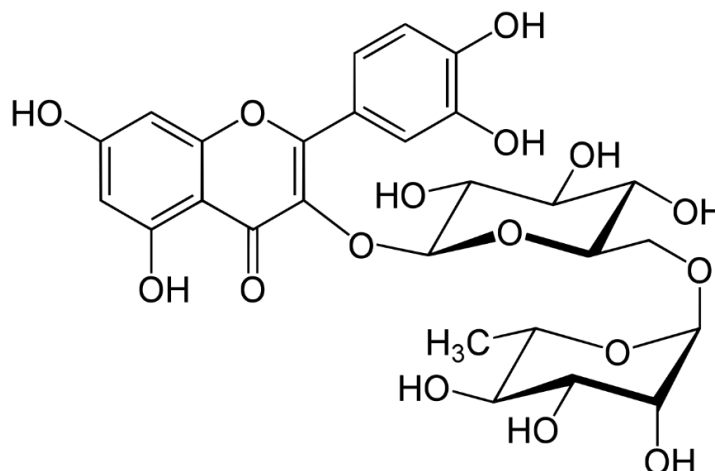


Рисунок 4 – Структурная формула 3-β-рутинозид кверцетина, 5,7-дигидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-3-(β-рутинозилокси)-4H-1-бензопиранон-4

Для получения раствора СО и анализируемого спиртового раствора субстанцию и СО рутозида растворяли в спирте этиловом 95 % с помощью ультразвуковой бани. Используя подобранную смесь ПФ, на стеклянных пластинках с силикагелем при УФ-365 нм детектировали светло-желтую флуоресцентную зону при $R_f = 0,36$, которая соответствует рутину (Рисунок 5).

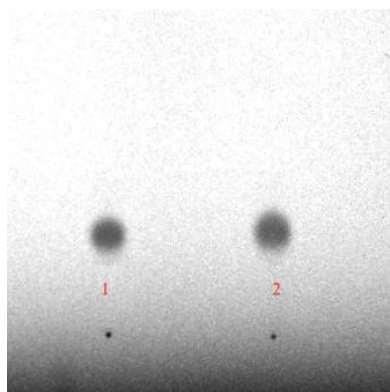


Рисунок 5 – Хроматограмма СО рутина (1) и субстанции рутозида (2)

Программа анализа BioVision была использована для количественной оценки и сравнения площади каждого пятна с захваченными изображениями хроматограммы. С помощью ПО BioVision был проведен расчет концентрации (в пикселях) полос (Таблица 5).

Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 2. Результаты представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Процентное содержание субстанции рутозид методом ВЭТСХ

Образец	Интенсивность рутина, %	Концентрация рутина в испытуемом растворе	
		%	мг
СО рутина	100	0,0500	50,0
АФС рутозид	99,96	$0,0475 \pm 0,01$	$47,50 \pm 0,18$ мг

В результате перерасчета получено процентное содержание рутозида с помощью метода ВЭТСХ – 95 %, что соответствует нормам, заявленным в ГФ РФ XV издания ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат». Согласно фармакопейной статье на субстанцию содержание рутозида должно быть не менее 95,0 % и не более 101,0 % в пересчете на безводное и свободное от остаточных органических растворителей.

Разработанная методика была валидирована в соответствии ГФ РФ XV ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» и фармакопеи ЕАЭС 2.3.14.0. «Валидация аналитических методик» по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты валидации

Показатель валидации	Критерий оценивания	Результат
Специфичность	Сравнение анализируемых пятен (Рисунок 5)	$R_f = 0,36$
Аналитическая область	по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели (Рисунок 6)	0,025 % до 0,175 % (0,75 мкг до 5,25 мкг)
Линейность	Анализ калибровочных образцов (Рисунок 7)	Коэффициент корреляции для калибровочной кривой составил 0,9979
Правильность	Анализ RSE, %	Соответствует НД
Прецизионность: повторяемость (день 1) внутрилабораторная прецизионность (день 2)	Анализ стандартного отклонения, % и RSD, %	Соответствует НД

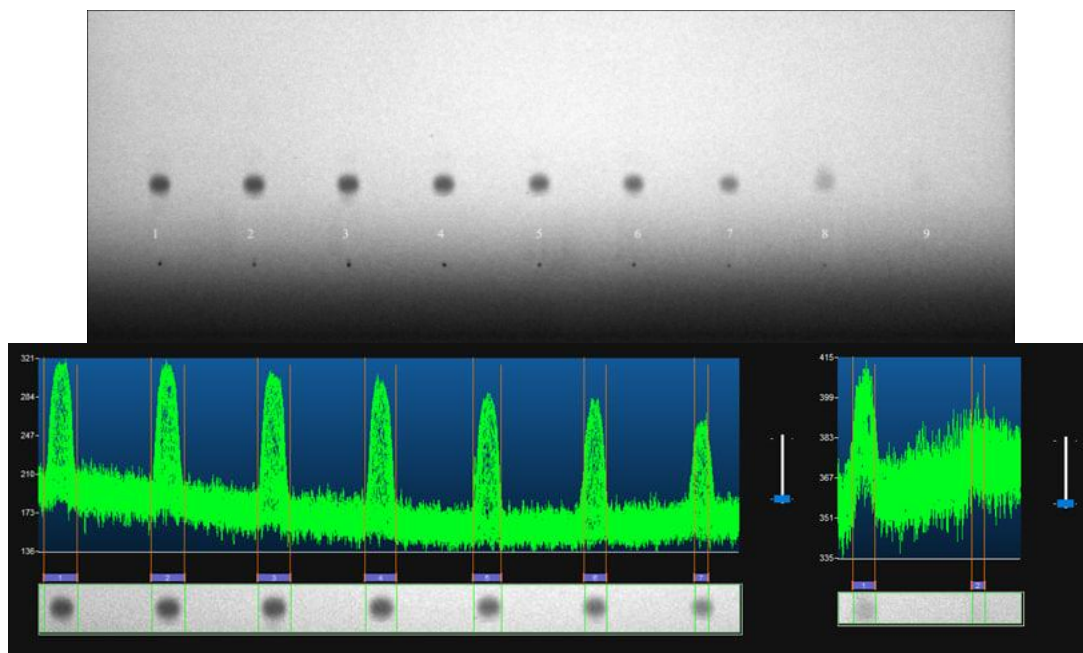


Рисунок 6 – Калибровочная хроматограмма с серией стандартных растворов (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 40:4,7:5,3 (v/v/v))

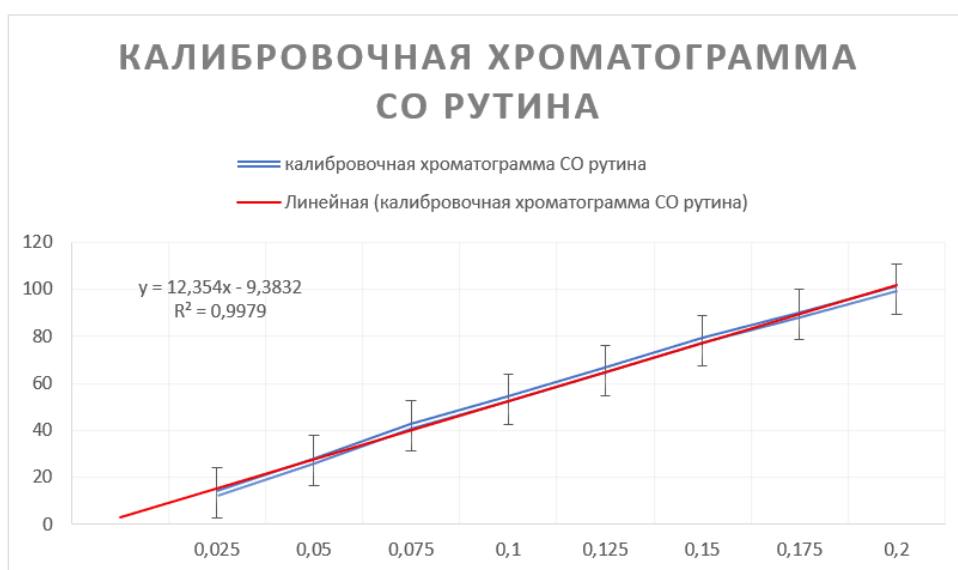


Рисунок 7 – График линейности рутина (ПФ: этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода в соотношении 40:4,7:5,3 (v/v/v))

Результаты валидации соответствуют требованиям ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик».

Анализ таблеток, содержащих рутозид

Хроматографические методы анализа широко используются в контроле качества многокомпонентных лекарственных препаратов. Как следствие необходимо существование валидированной методики для разделения действующих веществ и их последующего анализа. ТСХ является одним из доступных методов разделения и идентификации веществ, однако для

количественного определения его применение имеет значительные ограничения. ВЭТСХ способствует не только разделению веществ и их идентификации, но и проведению количественного анализа.

Экспериментальным путем подобрана оптимальная методика растворения таблетки «Аскорбиновая кислота + Рутозид», содержащей в своем составе 0,05 г рутозида и 0,05 г аскорбиновой кислоты, в соответствии с ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость» по методике для веществ с неизвестной растворимостью с применением ультразвуковой-бани: 0,330 г (точная навеска) измельченных таблеток растворили в 100 мл этилового спирта 95 %. Полное растворение наблюдалось при нагревании раствора в течение 2-3 минут на плите TLC Plate Heater III (Camag) при температуре 70°C. Концентрация рутозида в полученном растворе составляет 0,05 %.

В результате эксперимента были выявлены наиболее оптимальные условия разделения и анализа лекарственного препарата «Аскорбиновая кислота + Рутозид». Пластину хроматографировали в системе растворителей: этилацетат: муравьиная кислота безводная: вода (40: 4,7: 5,3). Представленная ПФ соответствует условиям хроматографирования субстанции рутозида.

На хроматограмме раствора СО рутина обнаруживается зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета (Рисунок 8). На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживаются две зоны адсорбции: одна зона желтого цвета, на уровне СО рутина (в видимом свете), вторая зона выше (УФ 365 нм), что соответствует аскорбиновой кислоте ($R_f = 0,83$).

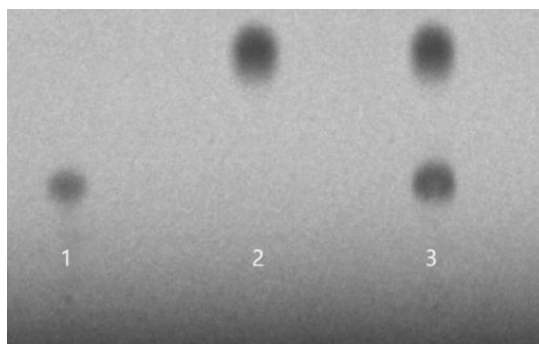


Рисунок 8 – Хроматограмма СО рутина (1), СО аскорбиновой кислоты (2) и рутозида в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» (3)

Количественное определение проводили с дальнейшей подстановкой полученных величин в расчетную формулу 2 в пересчете на среднюю массу таблетки. Результаты представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Процентное содержание рутозида и аскорбиновой кислоты в таблетках методом ВЭТСХ

Образец	Интенсивность, %	Концентрация действующих веществ	
		в испытываемом растворе, %	в таблетках, мг
СО рутина	100	0,0500	50,0
Рутозид в ЛС	98,455	0,04724± 0,01	47,24 ± 0,91
СО аскорбиновой кислоты	100	0,0500	50,0
Аскорбиновая кислота в ЛС	99,548	0,04729± 0,01	47,29 ± 0,97

В результате перерасчета процентное содержание рутозида методом ВЭТСХ в таблетках «Аскорбиновая кислота + Рутозид» составило 0,04724 %. В соответствии с нормативной документацией на препарат содержание рутозида должно быть от 46,25 до 53,75 мг, считая на среднюю массу таблетки, по результатам исследования получаем $47,24 \pm 0,91$ мг рутозида, что соответствует требованиям.

Разработанные методики были валидированы в соответствии с ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик», результаты валидации соответствуют требованиям нормативной документации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЭТСХ является перспективным и многофункциональным аналитическим инструментом для обеспечения качества и подлинности ЛРС и фитопрепаратов, сочетая в себе простоту, экономичность, высокую пропускную способность и способность работать со сложными растительными объектами, предоставляя при этом надежные и документированные результаты. Используя один из современных физико-химических методов анализа, разработаны методики идентификации и количественного определения рутина в лекарственных средствах методом ВЭТСХ.

ВЫВОДЫ

1) Изучено современное состояние и перспективы применения ВЭТСХ в контроле качества лекарственных средств в РФ и зарубежом. В настоящее время метод ВЭТСХ широко используется ведущими лабораториями мира для анализа ЛРС и лекарственных растительных

препаратов. ВЭТСХ является важным инструментом для анализа однокомпонентных и многокомпонентных объектов, в том числе фитопрепаратов, позволяющим работать с широким спектром соединений с высокой точностью и экономической эффективностью, способствующий проведению анализа одновременно по нескольким показателям.

2) Разработана методика качественного и количественного определения рутина методом ВЭТСХ на примере фармакопейного ЛРС (фиалки трава, *Violae herba*). Подобраны оптимальные хроматографические условия: состав подвижной фазы, объем анализируемого раствора, условия детектирования, позволяющие однозначно определить рутин в ЛРС среди всей суммы флавоноидов. Процентное содержание рутина в фиалке траве – $3,08 \pm 0,01\%$. Процентное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом в том же извлечении составило $3,43\%$. Полученные данные показывают, что рутин является основным флавоноидом в представленном ЛРС.

3) Валидирована методика определения рутина в ЛРС в соответствии с ГФ РФ XV издания ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям специфичность, аналитическая область, линейность. Показатель R_f (коэффициент удерживания) для рутина составил 0,4. Коэффициент корреляции для калибровочной кривой – 0,9977. Полученные результаты валидации показывают возможность рекомендовать методику для ее включения в ФС «Фиалки трава».

4) Проведен анализ определения рутина в растительных объектах с помощью разработанной методики ВЭТСХ. Разработанная методика была адаптирована для определения рутина в фитообъектах, являющихся источником рутина (гречихи посевная трава, *Herba Fagopyri esculenti* и софоры японской бутоны, *Alabastra Sophorae japonicae*). Процентное содержание рутина в гречихе траве – $4,82 \pm 0,03 \%$, в софоре бутонах – $6,16 \pm 0,01 \%$. Полученные результаты валидации показывают возможность рекомендовать методику для стандартизации описанных объектов, а полученное содержание показывает перспективность их применения в качестве получения рутина.

5) Разработанная методика была успешно применена для количественного определения рутина в многокомпонентном препарате, содержащем 50 мг аскорбиновой кислоты и 50 мг рутозида. В результате исследования было получено содержание рутина – $47,24 \pm 0,91$ мг, что соответствует требованиям нормативной документации. Результаты количественного определения субстанции рутозида методом ВЭТСХ соответствует требованиям ГФ РФ XV изд., ФС.2.1.0175 «Рутозид тригидрат» и ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик». Полученные результаты показывают легкость идентификации рутозида в многокомпонентных смесях, другие вещества не мешают разделению.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Расширение применения методов контроля качества в анализе лекарственных средств является актуальной проблемой для решения задач фармацевтической промышленности. В рамках диссертационной работы были изучены возможности применения ВЭТСХ в контроле качества лекарственных средств, содержащих рутин, и в растительных источниках его получения. Подобраны оптимальные условия хроматографирования. Разработаны методики идентификации и количественного определения рутина в лекарственных средствах и в растительных источниках его получения. Полученные результаты могут использоваться для стандартизации Гречихи посевной трава (*Herba Fagopyri esculenti*) и Софоры японской бутоны, (*Alabastra Sophorae japonicae*) – являющихся основными источниками получения рутина.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Предложенный подход, апробированный для внедрения ВЭТСХ в фармакопейный анализ рутин-содержащих лекарственных средств, рекомендуется к применению при решении сопоставимых задач контроля качества иных лекарственных препаратов растительного происхождения и ЛРС, содержащих другие группы БАВ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кобахидзе, Т.И.** Высокоэффективная тонкослойная хроматография как перспективный метод в контроле качества лекарственного растительного сырья / Т.И. Кобахидзе, Г.В. Раменская, В.И. Гегечкори // Вестник Южно-Казахстанской Медицинской Академии. – 2020. – Т. IV. – № 4(91). – С. 157.
2. **Kobakhidze, T.** HPTLC method for the determination of biologically active substances in important medicinal plants / T. Kobakhidze // Guangdong Pharmaceutical University, GDPU. – 2021. – P. 72.
3. HPTLC and FTIR Fingerprinting of Olive Leaves Extracts and ATR-FTIR Characterisation of Major Flavonoids and Polyphenolics / S. Agatonovic-Kustrin, V. Gegechkori, S. P. Dementyev, **T. I. Kobakhidze**, D. W. Morton // **Molecules**. – 2021. – Vol. 26. – № 22. – P. 6892. [Scopus]
4. **Кобахидзе, Т.И.** Количественное определения рутина в траве фиалки методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / Т.И. Кобахидзе, Г.В. Раменская // Биологические науки: традиции, достижения, инновации: сборник материалов I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня

рождения профессора К. А. Кузьминой. Саратов, 22 марта 2023 года. – Саратов. гос. мед. ун-т, 2023. – С. 65.

5. **Kobakhidze, T.** HPTLC analysis of the quality control of *Violae herba* / T. Kobakhidze // Semmelweis International Students Conference 2023 of Semmelweis University Budapest. – 2023. – Vol. 1. – № 1-344. – P. 37.

6. Количественное определение рутина в флавоноид-содержащем растительном сырье методом ВЭТСХ / **Т. И. Кобахидзе**, В. И. Гегечкори, Д. В. Чугаев, Г. В. Раменская // **Фармация**. – 2024. – № 2. – С. 13-17. [Chemical Abstracts]

7. **Кобахидзе, Т. И.** ВЭТСХ – перспективный метод количественного определения в фармацевтическом анализе / Т. И. Кобахидзе, М. В. Белова, С. П. Дементьев // **Естественные и технические науки**. – 2024. – № 2 (189). – С. 116-121. [Chemical Abstracts]

8. Количественное определения рутина методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии в контроле качества лекарственных средств / **Т. И. Кобахидзе**, С. Агатонович-Куштрин, С. П. Дементьев, Д. В. Чугаев, М. В. Белова // **Естественные и технические науки**. – 2025. – № 2 (201). – С. 118-125. [Chemical Abstracts]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФС – активная фармацевтическая субстанция

БАВ – биологически активное вещество

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

ПО – программное обеспечение

ПФ – подвижная фаза

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография